ПАРАЗИТОЛОГИЯ, 40, 1, 2006

УДК 593.195 : 595.733

МИКРОСПОРИДИОЗ ЛИЧИНОК СТРЕКОЗ AESHNA VIRIDIS (ODONATA: AESHNIDAE), ВЫЗЫВАЕМЫЙ SYSTENOSTREMA ALBA LARSSON, 1988 (MICROSPORIDIA: TELOHANIIDAE)

© Н. А. Крюкова, Ю. Я. Соколова, В. В Глупов

В личинках стрекоз *Aeshna viridis*, отловленных в водоемах Новосибирской обл., было зарегистрировано заражение микроспоридиями. Были выявлены только поздние стадии спорогенеза, который заканчивался формированием 8 овальных спор внутри округлого (12.3 ± 0.23 × 11.9 ± 0.2 мкм) спорофорного пузырька. Размер живых спор составлял 6.9 ± 0.09 × 4.1 ± 0.08 мкм. Жировое тело было единственным органом личинок, инфицированным микроспоридиями. На основании специфических черт морфологии одноядерных спор: формы, структуры полярной трубки с 9—10 крупными и 9—11 мелкими витками, строения поляропласта, задней вакуоли, многослойной оболочки и др., сибирский изолят отнесен к виду *Systenostrema alba*. Ранее микроспоридии данного вида были обнаружены в личинках стрекоз *Aeshna grandis* в Швеции (Larsson, 1988). Это первая находка микроспоридий в стрекозах Сибири.

Микроспоридии (тип Microsporidia Balbiani, 1882) представляют собой группу высокоспециализированных облигатных внутриклеточных паразитов. Микроспоридии поражают различные ткани большинства групп позвоночных и беспозвоночных животных (Исси, 1986; Canning, Vávra, 2000). Систематическое положение микроспоридий не до конца ясно: до недавнего времени их относили к простейшим субцарства Archeozoa, но филогенетический анализ, базирующийся на анализе последовательностей нуклеотидов генов рибосомальной РНК и нескольких белков, свидетельствует в пользу родства микроспоридий и грибов порядка Zygomycetes (Keeling, 2003).

В личинках стрекоз *Aeshna viridis* 5—6 возрастов, собранных в водоеме вблизи г. Новосибирска, было зарегистрировано заражение микроспоридиями. Задачей настоящей работы было описать характер заражения, изучить морфологические особенности обнаруженной микроспоридии с помощью световой и электронной микроскопий, а также идентифицировать найденный вид.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали личинок стрекоз 5—6 возрастов рода *Aeshna* (*A. viridis*). Личинки были собраны в пойме реки Нижняя Ельцовка Новосибирской обл. в период с конца мая до середины июня 2003 г. Помимо *Aeshna viridis* в данном водоеме были обнаружены личинки *A. grandis* и *A. juncea*. Видовую принадлежность личинок устанавливали по определителям Белышева (1973) и Харитонова (1997). Наличие инвазии регистрировали только после вскрытия личинок, так как внешние признаки микроспоридиоза отсутствовали. О заражении микроспоридиями свидетельствовала молочно-белая окраска жирового тела.

Индивидуально из каждой особи готовили мазки гемолимфы, жирового тела, кишечника и мышечной ткани, которые фиксировали метанолом и окрашивали по Романовскому-Гимза (Лилли, 1969). Всего были исследованы 172 личинки *Aeshna viridis*, 30 — *A. grandis* и 15 — *A. juncea*.

Для получения очищенных спор жировое тело зараженных личинок выделяли, гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе, полученную суспензию разливали в пробирки для центрифугирования, ресуспензировали в равном количестве дистиллированной воды и осаждали центрифугированием при 1000 g в течение 5 мин. Осадок ресуспензировали; в случае необходимости операцию повторяли до получения молочно-белого осадка, содержащего чистые споры.

Измерение размеров живых и фиксированных спор, а также фотографирование стадий развития паразита проводили с помощью микроскопа «Axioscope-40» («Zeiss») с фотографической насадкой «Axio Cam HRc».

Для электронной микроскопии жировое тело зараженных личинок фиксировали 2.5%-ным раствором глютарового альдегида на кокадилатном буфере. После отмывки в 0.1 М фосфатном буфере pH 7.2 с 0.15 М NaCl образцы постфиксировали 1%-ным раствором OsO_4 на фосфатном буфере с 2.5%-ной сахарозой. Обезвоживание проводили в серии спиртов повышающейся концентрации и в абсолютном ацетоне. Образцы заливали в эпон-аралдит. Тонкие срезы готовили на ультрамикротоме Reichert-Young, контрастировали цитратом свинца и насыщенным раствором уранил—ацетата в 50%-ном этаноле и просматривали в электронный микроскоп Hitachi-300.

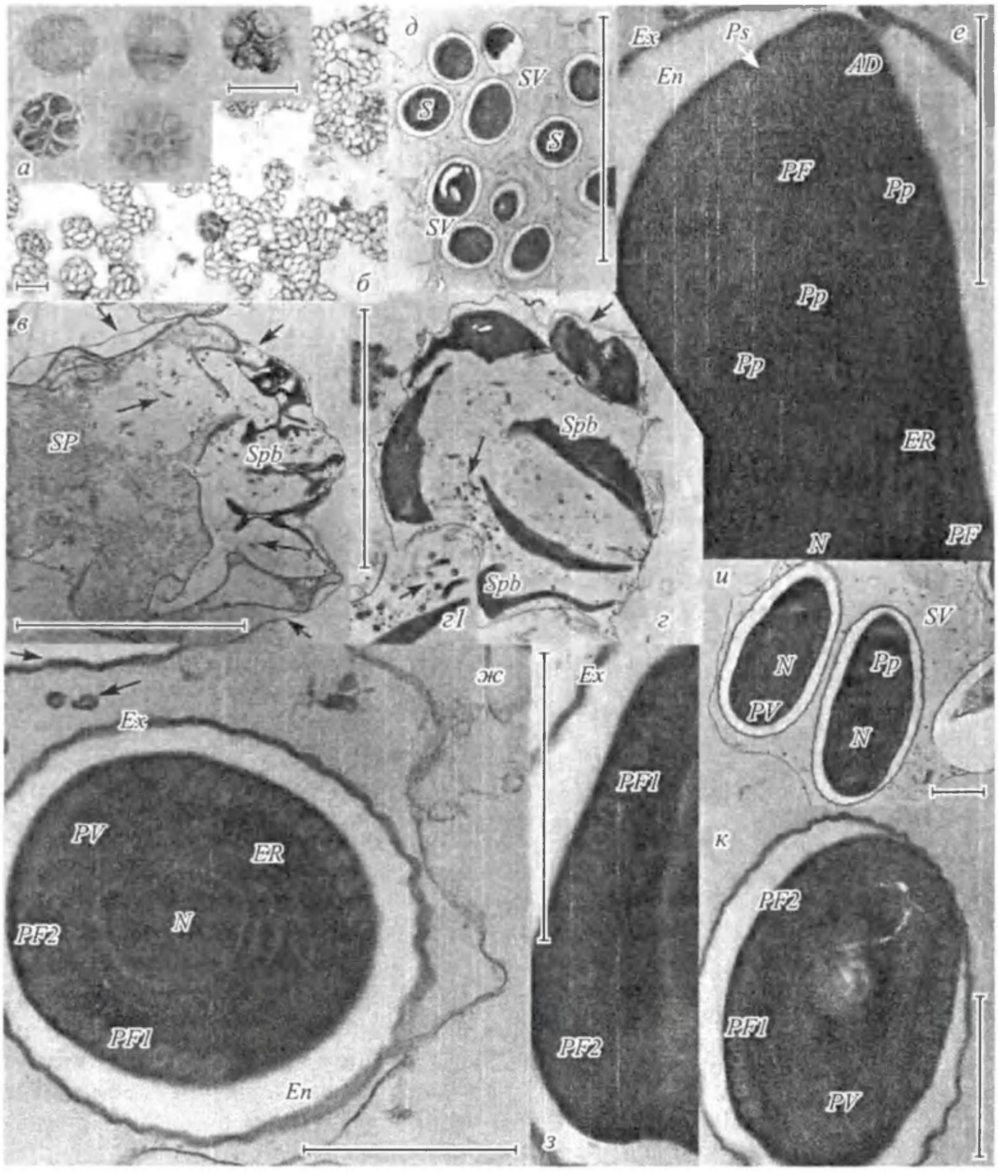
РЕЗУЛЬТАТЫ

Гистопатология. Внешних признаков, позволяющих судить о наличии паразитической инвазии, отмечено не было. Заражение микроспоридиями регистрировали только после вскрытия личинок. У 3.5% из всех просмотренных личинок *A. viridis* были выявлены споры и стадии спорогонии микроспоридий. Следует отметить, что данный вид стрекоз доминирует в водоемах Новосибирской обл. Менее распространенные виды — *A. grandis* и *A. juncea* — не были заражены микроспоридиями.

Микроспоридии развивались только в жировой ткани, которая при интенсивном заражении приобретала молочно-белый цвет. Жировое тело незараженных личинок было окрашено в зеленоватый цвет. Пораженная жировая ткань становилась хрупкой и при малейшем прикосновении легко разрушалась. Она содержала множество глянцевых белых узелков, «цист», отчетливо видимых в бинокуляр.

Световая микроскопия. Световая микроскопия мазков жирового тела, пораженного микроспоридиозом, показала, что «цисты», так же как и окружающее их жировое тело, содержали спорофорные пузырьки с 8 спорами или споробластами внутри. На мазках были обнаружены все стадии спорогенеза и некоторые преспоровые стадии.

Деление (образование долей) спорогонального плазмодия начиналось с 4-ядерной стадии и оканчивалось формированием 8 одноядерных спороба-



Световая и электронная микроскопии *Systenosterma alba* Larsson, 1988, выделенной из личинки стрекозы *Aeshna viridis*.

Световая микроскопия — мазки жирового тела, фиксированные метанолом и окрашенные по Романовскому-Гимза (*а*, *б*): *а* — преспоровые стадии спорогонии, *б* — спорофорные пузырьки со спорами внутри. Электронная микроскопия (*в—к*) — *в* — остатки спорогонального плазмодия внутри спорофорного пузырька. В правой части спорофорного пузырька видны сформированные споробласты. Длинные стрелки — трубковидные эписпорогональные включения, короткие — оболочка спорофорного пузырька; *г* — споробласты внутри спорофорного пузырька. Длинными стрелками обозначены трубковидные включения, короткими — оболочка спорофорного пузырька; *г1* — трубковидные включения при большом увеличении; *д* — поперечный срез через спорофорный пузырек со спорами; *е* — передний полюс зрелой споры; *ж* — поперечный срез через спору. Видны очертания эндоплазматического ретикулума, окружающего ядро, и анизофилярная структура полярного филамента. Длинные стрелки — трубковидные включения внутри спорофорного пузырька, короткие — оболочка спорофорного пузырька; *з* — продольный срез через спору (видно, что передние и задние витки полярного филамента имеют разный диаметр); *и* — две споры с характерными для *Systenosterma* вытянутыми ядрами; *к* — продольный срез через спору (в поле зрения анизофилярный полярный филамент и крупная задняя вакуоль). AD -- якорный диск, En — эндоспора, ER — эндоплазматический ретикулум, Ex — экзоспора, N — ядро, Pf — полярный филамент, Pf 1 — передняя часть полярного филаменстов (см. рисунок, *а*). Размеры зрелых нефиксированных спор составляли 6.9 ± 0.09 мкм в дл. и 4.1 ± 0.08 мкм в шир. (n = 50) (размах варьирования 6.0—7.6 × 3.5—4.9), после фиксации спор метанолом и окраски по Романовскому-Гимза — 4.6 ± 0.06 × 2.8 ± 0.05 мкм. Округлые (12.3 ± 0.23 × × 11.9 ± 0.20 мкм (n = 50)) спорофорные пузырьки со спорами внутри хорошо прокрашивались и составляли подавляющее большинство стадий паразита, выявляемых на мазках (см. рисунок, *б*).

Электронная микроскопия. Электронно-микроскопический анализ выявил только поздние стадии спорогонии и зрелые споры. Наиболее ранней из наблюдаемых стадий был спорогональный плазмодий, от которого предположительно путем розетковидного почкования дифференцировались споробласты (см. рисунок, *в*). Плохая сохранность споробластов не позволила детально изучить их ультраструктуру. Спорофорные пузырьки на этой стадии содержали «трубчатые включения» (см. рисунок, *г*), формирующиеся, по всей видимости, как дериваты оболочки споробласта (см. рисунок, *г1*). Зрелые споры были всегда окружены оболочкой спорофорного пузырька (см. рисунок, *д*, *ж*, *и*). По мере созревания спор трубчатые структуры внутри эписпорального пространства выявлялись реже. Стенки «трубочек» по своей внутренней структуре напоминали оболочку экзоспоры (см. рисунок, *ж*). Толщина оболочки спор составляла 230—295 нм, сужаясь до 70—125 нм на переднем полюсе. Оболочка состояла из унитарной мембраны, толщиной приблизительно 7—9 нм, широкой эндоспоры и экзоспоры, толщиной 25—35 нм, центральным компонентом которой была трехслойная структура типа унитарной мембраны (см. рисунок, *ж*, *з*).

Пластинчатый поляропласт состоял из 2 частей: передней, с плотно упакованными ламеллами («cavum», по терминологии Weiser, Žižka, 1975) и задней с более свободно упакованными ламеллами (см. рисунок, *е*). Поляропласт заканчивался на уровне верхнего витка полярной трубки. Апикальная часть споры, включая дисковидный якорный диск, многослойную полярную шапочку и полярный сак, охватывающий приблизительно $^{1}/_{3}$ поляропласта, имела типичное строение (Vávra, Larsson, 1999) (см. рисунок, *е*, *ж*). Манубриальная часть полярной трубки состояла из прямого и слегка скошенного участков. Угол наклона первых витков полярной трубки к длинной оси споры составлял 50—55° (см. рисунок, *е*). Длинная анизофилярная полярная трубка состояла из 9—10 передних и 10—11 задних витков меньшего диаметра (см. рисунок, *ж*—*к*). Единственное ядро споры имело вытянутую форму и было окружено несколькими рядами эндоплазматического ретикулума. Диаметр задней вакуоли варьировал от 100 до 300 нм, по-видимому, в зависимости от зрелости споры. Вакуоль, содержащая трубчатые структуры, по строению напоминала постеросому (Weiser, Žižka, 1975) или тубуло-везикулярный кластер (Sokolova et al., 2001).

та, Pf 2 — задняя часть полярного филамента; Pp — поляропласт, Ps — полярная шапочка, PV — задняя вакуоль, S — спора, SP — сорогональный плазмодий, Spb — споробласт, SV — сорофорный пузырек. Масштабные линейки, мкм: *а*, *б* — 10; *в*—*д* — 5; *е*—*к* — 1.

Light and electron microscopy of *Systenostrema alba* Larsson, 1988 from the dragonfly *Aeshna viridis* larvae.

ОБСУЖДЕНИЕ

Идентифицировать найденных в Сибири микроспоридий как *Systenostrema alba* Larsson, 1988 (Larsson, 1988) позволяют следующие характерные особенности строения спор: овальная, слегка грушевидная форма спор с характерным «затупленным» концом; практически круглые спорофорные пузырьки, содержащие трубковидные включения; наличие одного вытянутого ядра; длинная анизофилярная полярная трубка с более или менее равным количеством витков большего и меньшего диаметра; оболочка споры с довольно широкой эндоспорой и экзоспорой, основным элементом которой является структура типа унитарной мембраны; наличие пластинчатого двухчастного поляропласта с передней частью, образованной очень плотно упакованными мембранами; относительно некрупная задняя вакуоль с трубчатым материалом внутри. Следует также отметить, что специфичность по отношению к хозяину (паразитирование в личинках стрекоз рода *Aeshna*), тканевая локализация (жировое тело) и характер патогенеза (отсутствие внешних симптомов заражения, изменение цвета жирового тела) совпадают у описываемой микроспоридии и типового изолята, выделенного из *A. grandis* в Южной Швеции (Larsson, 1988). Подробный сравнительный анализ признаков, отличающих различных представителей рода *Systenostrema* (Hazard, Oldacre, 1975) друг от друга, а также от микроспоридий других родов сем. Thelohaniidae, приведены в работе Ларсона (Larsson, 1988). В настоящее время к данному роду относят 6 видов: *S. tabani* (Hazard, Oldacre, 1975), *S. alba* (Larsson, 1988), *S. candida* (Larsson, 1988), *S. corethrae* (Schuberg, Rodrigues, 1915 — цит. по: Larsson, 1986), *S. trichosstegiae* (Baudoin, 1969; Larsson, 1988), а также *S. scapholeberi* (Воронин, 1986, 1999). Все представители рода формируют грушевидные или овальные октоспоры внутри спорофорного пузырька, обладают анизофилярной полярной трубкой (считается, что у *S. trichosstegiae* задние витки редуцированы (Larsson, 1988)) и паразитируют в жировой ткани личинок насекомых или в ракообразных отряда Cladocera, обитающих в пресных водоемах (см. таблицу).

Для Сибирского изолята характерны и некоторые отличия. 1) сибирский изолят характеризуется спорами более крупных размеров; 2) сибирский изолят не формирует макроспор, типичных для шведского изолята; 3) шведский и сибирский изоляты развиваются в различных хозяевах *A. grandis* и *A. viridis* соответственно; 4) развитие сибирского изолята сопровождается образованием «цист», содержащих споры, в то время как для шведского изолята такие образования не отмечены (Larsson, 1988). Ни одно из упомянутых различий, на наш взгляд, не может служить серьезным доводом против идентификации найденного вида, как *S. alba*. Размеры спор микроспоридий, в частности, у представителей рода *Systenostrema* могут значительно варьировать в пределах одного вида (Larsson, 1986). Макроспоры это, по сути дела, тератоспоры, образовавшиеся в результате неразделения октоспор (Knell et al., 1977; Sokolova et al., 2003), и их формирование может быть объяснено специфическими местными условиями. Интересно, что только в 1 из 6 локальных шведских изолятов *S. corethra* были выявлены макроспоры (Larsson, 1986). Можно предположить, что Швеция — граница ареала распространения *S. alba*, где условия для его развития не являются оптимальными. Формирование мелких спор, а также частая встречаемость тератоспор может быть связана именно с этим фактором. *A. grandis* — более редкий вид на территории Южной Сибири (Белышев, 1973), чем *A. viridis*, а малочисленные популяции хозяина обычно реже поражаются микроспори-

Состав рода *Systenostrema*

Composition of the genus *Systenostrema*

Виды паразитов	Виды хозяев	Характерные признаки строения спор	Источник
S. tabani, type species	*Tabanus lineola* (Diptera)	Споры 3.3 × 2.1 мкм, овально-грушевидные, ПТ: 6 + 9*	Hazard, Oldacre, 1975
S. alba	*Aeshna grandis* (Odonata)	Споры 4.9—6 × 2.5—3 мкм, вытянутые, слегка грушевидные, ПТ: 9—11 + 9—10	Larsson, 1988
S. candida	*Libellula quadrimaculata* (Odonata)	Споры 5.1—6 × 3.2—3.5 мкм, грушевидные, ПТ: 9—11 + 4—5	Larsson, 1998
S. corethrae	*Chaoborus crys tallinus* (Diptera)	Споры 2.9—4.2 × 4.2—7.1 мкм, овально-грушевидные, ПТ: 2—5 + 13—16	Larsson, 1986
S. trichostegiae	*Trichostegia minor* (Diptera)	Споры 8.5 × 4.0 мкм, овальные, 20 витков ПТ: 20**	Baudoin, 1969; Larsson, 1988
S. scapholeberi	*Scapholeberis muconata* (Cladocera)	Споры 3.75 × 1.6 мкм, грушевидные, ПТ: 3—4 + 2—3	Voronin, 1986, 1999

Примечание. * — полярная трубка (ПТ): X + X — число крупных (передних) витков + число мелких (задних) витков анизофилярной полярной трубки. ** — витки полярной трубки разного диаметра.

диями (Исси, 1986). Скорее всего, все виды стрекоз рода *Aeshna* восприимчивы в той или иной степени к *S. alba*. Возможно, лишь недостаточное количество обследованных личинок стрекоз видов *A. grandis* и *A. juncea* не позволило выявить у этих видов инфекцию. Формирование «цист», как правило, характеризует финальную стадию микроспоридиоза (Sokolova et al., 2005). Вполне вероятно, что при описании вида Ларсон (Larsson, 1988) имел дело с более ранними стадиями патогенеза (в своей работе он детально описывает также стадии мерогонии), когда «цисты» еще не начали формироваться.

Это первая зарегистрированная находка микроспоридий в личинках стрекоз, обитающих в водоемах России и Сибири. Однако, по неопубликованным данным И. В. Исси, на территории Санкт-Петербургской обл. были также отмечены единичные случаи заражения личинок стрекоз (персональное сообщение).

Настоящая работа демонстрирует, во-первых, ценность детальных ультраструктурных описаний, подобных сделанным Ларсоном (Larsson, 1986, 1988), и их достаточность для идентификации вновь найденных видов. Во-вторых, она показывает насколько широким может быть ареал обитания одного вида микроспоридии. В-третьих, данная работа вносит вклад в накопление пока еще немногочисленных данных о сходстве и различиях географических изолятов микроспоридий одного вида, что в свою очередь является важным шагом к анализу внутривидового полиморфизма и процесса видообразования в этой уникальной группе протистов.

Авторы выражают искреннюю признательность Ирме Викторовне Исси за плодотворную дискуссию и критический анализ первого варианта рукописи.

Исследование частично поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 04-04-49314а и 03-04-49629а).

Список литературы

Белышев Б. Ф. Стрекозы Сибири. Новосибирск: Наука СО РАН, 1973. Т. 1. 620 с.

Воронин В. Н. Микроспоридии ракообразных // Микроспоридии / Под ред. Т. В. Бейер, И. В. Исси. Протозоология. Л.: Наука, 1986. Вып. 10. С. 137—166.

Воронин В. Н. Микроспоридии пресноводных беспозвоночных и рыб России: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб., 1999. 712 с.

Исси И. В. Микроспоридии как тип паразитических простейших // Микроспоридии / Под ред. Т. В. Бейер, И. В. Исси. Протозоология. Л.: Наука, 1986. Вып. 10. С. 6—136.

Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир, 1969. 970 с.

Харитонов А. Ю. Стрекозы // Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий. Т. 3. Паукообразные и низшие насекомые. СПб.: Наука, 1997. 222 с.

Baudoin J. Nouvelles espèces de Microsporidies chez des larves de Trichoptères // Protistologica. 1969. Vol. 5. P. 441—446.

Canning E. U., Vàvra J. Phylum Microsporida // An illustrated guide to the Protozoa. Second edition. Society of Protozoologists / Ed. by J. J. Lee, G. F. Leedale, P. Bradbury P. Lawrence, Kansas, USA, 2000. P. 39—126.

Hazard E. I., Oldacre S. W. Revision of microsporidia (Protozoa) close to Thelohania, with descriptions of one new family, eight new genera, and thirteen new species // Technical Bulletin United States Department of Agriculture // 1975. P. 1—104.

Keeling P. J. Congruent evidence from alpha-tubulin and beta-tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia // Fungal Genetics and Biology. 2003. Vol. 38. P. 298—309.

Knell J. D., Allen G. E., Hazard E. I. Light and electron-microscope study of Thelohania solenopsae n. sp. (Microsporida: Protozoa) in red imported fire ant, Solenopsis invicta // Journ. Invertebr. Pathol. 1977. Vol. 29. P. 192—200.

Larsson R. Development, ultracytology and taxonomical Position of Thelohania corethrae Schuberg and Rodrigues, 1915 (Microspora, Thelohaniidae) // Arch. Protistenk. 1986. Bd 132. S. 245—264.

Larsson J. I. R. On the taxonomy of the genus Systenostrema Hazard and Oldacre, 1975 (Microspora, Thelohaniidae), with description of teo new species // System. Parasitol. 1988. Vol. 11. P. 3—17.

Sokolova Y., Snigirevskaya E., Morzhina E., Skarlato S., Mironov A., Komissarchik Y. Visualization of early Golgi compartments at proliferate and sporogenic stages of a microsporidian Nosema grylii // Journ. Eukaryotic Microbiol. 2001. Vol. 75. P. 86—87.

Sokolova Y. Y., Dolgikh V. V., Morzhina E. V., Nassonova E. S., Issi I. V., Terry R. S., Ironside J. E., Smith J. E., Vossbrinck C. R. Establishment of the new genus Paranosema based on the ultrastructure and molecular phylogeny of the type species Paranosema grylli Gen. Nov., Comb. Nov (Sokolova, Selezniov, Dolgikh, Issi 1994), from the cricket Gryllus bimaculatus // Journ. Invertebr. Pathol. 2003. Vol. 84. P. 159—172.

Sokolova Y. Y., Fuxa J. R., Borkchsenious O. N. About Thelohania solenopsae «cysts» produced in abdomens of red imported fire ants Solenopsis invicta // Journ. Invertebr. Pathol. 2005. (In press).

Vávra J., Larsson J. I. R. Structure of the Microsporidia // The Microsporidia and Microsporidiosis. American Society of Microbiology / Ed. by M. Wittner, L. M. Weiss. 1999. P. 7—84.

Weiser J., Žižka Z. Stages in sporogony of Plistophora debaisieuxi Jirovec // Acta Protozoologica. 1975. Vol. 14. P. 185—194.

Институт систематики и экологии животных СО РАН,
Новосибирск,
Институт цитологии РАН,
Санкт-Петербург

Поступила 28 V 2005

MICROSPORIDIOSIS OF THE DRAGONFLY AESHNA VIRIDIS LARVAE (ODONATA: AESHNIDAE) CAUSED BY SYSTENOSTREMA ALBA LARSSON, 1988 (MICROSPORIDA: THELOHANIIDAE)

N. A. Kryukova, Yu. Ya. Sokolova, V. V. Glupov

Key words: Microsporidia, *Systenostrema*, *Thelohania*, ultrastructure, Odonata, *Aeshna viridis*.

SUMMARY

A microsporidian species producing octospores in sporophorous vesicles is found in *Aeshna viridis* larvae from intermittent streams situated in the vicinity of Novosibirsk City. Size of the spores measured on fresh smears was 6.9 ± 0.09 µm × 4.1 ± 0.08 µm (6.0—7.6 × 3.5—4.9). Each spore have single elongated nucleus and an anisofilar polar filament composed of 10—11 anterior and 10—11 posterior coils. The infection was restricted to adipose tissue. According to spore morphology the Siberian isolate can be attributed to the species *Systenostrema alba* described from *Aeshna grandis* in Sweden (Larsson, 1988). This is the first description of Microsporidia infecting Odonata from Siberia.